

编 号: (78)026

内 部

出国参观考察报告

西德生物膜研究概况

科学技术文献出版社

出国参观考察报告

西德生物膜研究概况

(内部发行)

编辑者: 中国科学技术情报研究所

出版者: 科学技术文献出版社

印刷者: 中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

开本 $787 \times 1092 \cdot \frac{1}{16}$ 2.25 印张 59千字

统一书号: 13176·43 定价: 0.28

1979年4月出版 印数: 7600册

目 录

一、生物膜基本结构	(1)
(一) 膜结构的动态性质	(2)
(二) 膜蛋白和膜脂的相互作用	(3)
(三) 关于光学探针(激发态稳定双体)在生物膜研究中的应用	(5)
二、线粒体膜的结构与功能	(6)
(一) 线粒体内膜ADP-ATP运转的研究	(6)
(二) 线粒体内膜辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物的分离、提纯、析离与重组	(8)
(三) 线粒体的生物发生	(19)
(四) 线粒体内膜的Ca ²⁺ 运转功能	(10)
三、生物膜能量转换ATP酶复合体的研究	(10)
(一) DCCD—结合蛋白氨基酸序列的测定	(11)
(二) ATPase (F ₁) 亚基的研究	(11)
(三) Micrococcus的BF ₁ 的研究	(11)
四、物质运送	(11)
(一) 质膜的离子运送	(12)
(二) 上皮细胞腔面膜的物质运送	(13)
(三) 酶通过质膜的释放	(13)
(四) 大肠杆菌 β -半乳糖苷的运送	(14)
(五) 海水淡化的理论研究	(14)
五、肌质网膜钙泵的研究	(14)
(一) 钙泵与能量转换	(15)
(二) 钙离子运转分子机理的研究: 运转中间物——磷蛋白的形成	(15)
(三) 肌质网膜去类脂后功能的变化及其重激活的研究	(16)
六、受体	(16)
(一) 乙酰胆碱受体	(16)
(二) Semliki森林病毒受体	(17)
七、细胞表面膜	(17)
(一) 细胞表面膜的形态	(17)
(二) 细胞表面电荷	(19)
(三) 细胞表面膜与肿瘤治疗	(21)
八、光合膜方面的研究	(21)
(一) 弗来堡大学第二生物研究所	(22)
(二) 哥廷根大学	(24)
(三) 法兰克福大学物理生物化学和生物化学研究所	(26)
(四) 慕尼黑大学生理化学、物理生物化学和细胞生物学研究所	(26)
附录: 各参观单位概况介绍	(27)

西德生物膜研究概况

中国科学院赴西德考察生物膜代表团

中国科学院生物膜代表团应西德马克思—普朗克协会邀请，于1978年5月17日至6月8日到西德慕尼黑、汉堡、法兰克福、哥廷根、海德堡、弗来堡、乌尔姆、图宾根八个城市进行了访问。访问期间，代表团参观了18个研究单位：马克思—普朗克协会生化研究所，慕尼黑大学生理化学、物理生物化学、细胞生物化学研究所，汉堡大学实验病毒和免疫研究所，马克思—普朗克协会生物物理研究所，马克思—普朗克协会生物物理化学研究所，马克思—普朗克协会医学研究所，马克思—普朗克协会免疫生物化学研究所，马克思—普朗克协会病毒研究所，马克思—普朗克协会生物化学研究所，欧洲分子生物学实验室，西德肿瘤研究中心，法兰克福大学生化所，乌尔姆大学实验物理系，弗来堡大学的第Ⅱ生物研究所和生物物理和放射生物研究所，哥廷根大学的植物生化教研室和植物生理研究所以及法兰克福大学的物理化学和生物化学研究所。现将参观访问中看到的西德生物膜研究概况简单介绍如下。

一、生物膜基本结构

六十年代末期到七十年代初以来，生物膜结构流体性概念的建立是膜分子生物学研究新发展的一个重要标志，这主要是由于各种物理和化学手段对膜脂双分子层的物理性质及其与膜蛋白的相互作用等方面广泛研究的结果。虽然，在生物膜的基本结构一些主要概念，如“流体镶嵌膜”模型，“膜蛋白复合体”及“膜双分子层的不对称性”等大都是美、英等国科学家首先提出和证实的。但是，在膜结构的物理研究方面，西德同样也有自己突出的贡献，特别是对膜脂相变，脂分子扩散运动，侧向分相，膜蛋白运动以及镶嵌脂结构等方面，他们都作出很多重要研究，测定了很多重要参数，从而对生物膜的基本结构问题有了更深入的理解。近几年来，他们特别注重发展膜结构物理的研究，对膜平面区域结构（分相）的形成条件及其生理意义，膜蛋白之间及其与膜脂的相互作用的协同效应等又进行了许多新研究，提出了膜中蛋白之间长距离相互作用的“脂弹性力场”和“蛋白凝聚作用”等理论模型（1977）。在研究技术方面，除了电镜、冰冻刻蚀等基本技术手段外，他们注重发展各种光谱技术（顺磁，各种荧光光谱，核磁，激光拉曼），尤以运用和发展测定“激发态荧光稳定双体”（Excimer）的技术，来定量地研究膜分子的动态特性，如对扩散系数，侧向分相，脂交换反应动力学等的测定等比较突出，表现了自己的特色。除了采用各种化学合成的磷脂及天然磷脂制成各种组份的脂质体（Liposome）外，主要还对大肠杆菌细胞质膜，兔肝细胞内质网膜等进行了较多的研究。领导这方面研究的主要科学家是Sackmann（乌尔姆大学实验物理系）和Marsh（马克思—普朗克协会的生物物理化学研究所）。

物所)等。

总的讲,西德对生物膜的基本结构的研究十分重视,设备相当先进,目前已建立了两个以上基础相当雄厚的理论研究基地(哥廷根生物物理化学所,乌尔姆大学实验物理Ⅲ系),从发展的趋势来看,他们试图在膜结构的理论方面建立自己的思想体系或学派,有关发展动向值得我们注意。

(一) 膜结构的动态性质

Träuble, Sackmann, Marsh, 等人用光谱技术研究了膜双分子层的相变及其控制条件,他们用ANS等荧光探针证明在脂相变的温度条件下,有急剧的荧光增强,这是由于在膜的流体态时增加了荧光探针从水相到脂相的转移的结果。(他们发现脂的相变温度(T_t)依赖于磷脂的头部极性部性质和脂肪链的长短,如卵磷脂的相变温度随其所含饱和脂肪酸链的增长而升高,如 C_{14} 的 $T_t=24^{\circ}\text{C}$, C_{16} 的 $T_t=41^{\circ}\text{C}$, C_{18} 的 $T_t=58^{\circ}\text{C}$ 。)若磷脂的脂肪酸链含有顺式不饱和双键,则其 T_t 大大低于其相应的含饱和脂肪酸磷脂的 T_t 。如二油酸磷脂酰胆碱($\text{di}C_{18}:1$)的 $T_t=-22^{\circ}\text{C}$,而二硬脂酸磷脂酰胆碱($\text{di}C_{18}:0$)的 $T_t=58^{\circ}\text{C}$ 。显然,膜脂的不饱和脂肪酸成分有助于维持在生理温度下膜的流动性。)Träuble(1971)等尚证明在膜脂相变时伴随有磷脂极性部位排列的变化。近来(1975)他们又证明,当二棕榈卵磷脂(DPL)从晶态到液晶态的相变中,约有30个分子一起协同相变,其协同性随脂肪酸的链长而增加。Overath和Sackmann等人运用兼性的自旋标记的硬脂酸研究了大肠杆菌质膜在相变时发生的结构变化,用单一不饱和脂肪酸培养大肠杆菌,使其质膜中含有大量带此种不饱和脂肪酸的磷脂,然后测定膜相变温度,结果发现其相变温度和这些不饱和脂肪酸的 T_t 相一致。(他们还证明膜的相变对调控膜蛋白的功能,如糖转运蛋白的活性有重要意义,即在 T_t 时当膜脂处于流动态时,糖转运活性即增高。Träuble和Eibl等尚证明通过pH或离子强度的变化,或者离子和其他配基与膜脂的结合可以诱发膜脂的等温相变。)

(膜分子的侧向扩散运动是膜结构流动性的一个重要指标。)Träuble, Sackmann等运用自旋标记方法测定二棕榈酰卵磷脂,大肠杆菌质膜,肝内质网膜在 T_t 时的脂分子侧向扩散系数,结果证明它们约都在 $1-10 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{秒}$ 的范围内(二棕榈酰卵磷脂 50°C 时 $D=3 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{秒}$,大肠杆菌质膜 40°C 时 $D=3 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{秒}$,肝内质网膜 30°C 时 $D=11 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{秒}$)。这些参数和其它作者在同一时期对其它磷脂和膜的测定结果相当一致,说明在生物膜中,当膜流体态时,脂分子的侧向扩散运动是很快的,相当于每秒钟约有 10^7 分子互相交换,或者说每个脂分子每秒钟能移动1微米的距离。

他们进一步研究了自旋标记化合物TEMPO-磷酸(水溶性)和硬脂酸的N-oxy-4,4-dimethylloxazolidine衍生物(脂溶性)被内质网膜细胞色素 P_{450} 还原酶的还原动力学及其对温度变化(相变)的关系。通过还原反应速率常数的Arrhenius图比较,证明这两种自旋标记化合物在膜中的行为的明显差别。脂肪酸还原的活化能在 30°C 以下为 30.8 kcal/mole ,到 32°C 以上时急剧降低到 8.7 kcal/mole 。相反,对水溶性的TEMPO-磷酸来说,还原反应的活化能值在整个测定温度范围内均保持在 13.8 kcal/mole 的水平。试验表明在膜中细胞色素 P_{450} 还原酶周围可能包围一层准晶态结构的磷脂分子(当其在 32°C 时才出现晶态-液晶态的相变)。而不与酶结合的其余磷脂区则表现为流体态结构,因为若自旋标记的脂肪酸结合到膜中,其扩散系数在 30°C 时为 $D=11.0 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{秒}$,而其扩散作用的活化能只有 $\Delta W=3.84$

kcal/mole。从而进一步表明膜中存在脂质不均一性的镶嵌结构。

生物膜的侧向分相现象对膜功能的调节具十分重要意义。Gulla和Sackmann (1975) 研究了 Ca^{++} 、聚赖氨酸等对膜脂分相的影响。他们用卵磷脂-磷脂酸混合脂质体膜进行ESR测定, 结果发现在流体态时膜平面出现脂的聚合。在卵磷脂低浓度时, 在磷脂酸膜的流体区内, 形成含25—40%卵磷脂的聚合体。在二棕榈酰卵磷脂和二苈蔻酰磷脂酰乙醇胺膜中, 自旋标记的卵磷脂在相变温度以上呈无规则的分布, 其侧向扩散系数 $D=2.8 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{秒}$ (59°C), 加入 Ca^{++} 后, 可诱发形成 Ca^{++} 结合磷脂酸的晶块, 卵磷脂则从这些晶块中排出, 表现明显的分相。聚赖氨酸和 Ca^{++} 一样具有强烈增加卵磷脂的聚合作用。聚赖氨酸与磷脂酸结合后的相变 T_t 从 47.5°C 转为 62°C 。他们推测在脂质中以及在生物膜的表面蛋白中可能存在协同的构相转变问题。

近来Sackmann (1977) 等又用冰冻刻蚀技术直接证明聚赖氨酸或 Ca^{++} 引起的分相可导致形成脂质体膜上的脂区块 (Lipid Domain Structure) 结构, 在电镜下表现为直径100 Å到1000 Å不等的圆形斑块。而按1:1比例混合的卵磷脂和磷脂酸的脂质体膜上在不加入聚赖氨酸或 Ca^{++} 时表现为光滑的膜表面和双分子层的疏水区。他们还进一步用(1)激发态稳定双体的荧光技术(2)自旋标记技术(3)冰冻刻蚀电镜技术三种方法配合, 对胆固醇、二棕榈酰卵磷脂、二油酰卵磷脂和二棕榈酰磷脂酸等混合磷脂脂质体膜结构进行了研究, 其主要结果:(1)不同对称面的碟状液晶分子相的混合体都进行侧向分相,(2)分相导致形成区块状的侧向脂结构,(3)区块结构常常伴随有各种不同的局部弯曲结构,(4)在含有常带电荷的极性磷脂的膜中, 区块结构常常可由外界带电荷化合物(如表面蛋白)所诱发,(5)发现有两种类型区块结构: 1)圆形区块, 直径约几百埃左右, 在不倾斜的刚性结构相的混合脂中出现, 2)长形区块, 宽径100 Å左右, 在倾斜和非倾斜的混合脂中出现。对于卵磷脂和胆固醇的混合脂膜来说, 这种形式的区块结构是特征性的。结果表明, 在膜中, 高度流动性的脂区和非任意分布的脂区可能是同时存在的, 而区块结构的形成是脂分子片层结构的不同多形态的对称的差别所导致的自然结果。

膜蛋白在膜中的旋转运动和侧向扩散运动的研究不仅对膜结构的装配, 而且对免疫反应, 膜融合, 感觉传导和生化代谢反应都是极其重要的。总的讲这方面工作开展的不多。Sackmann等(1973)根据脂分子的跳动频率(hopping frequency, $\nu=10^7\text{Hz}$)测定出膜蛋白的旋转和扩散速度。对于半径为25 Å的蛋白来说, 它的旋转弛豫时间约等于75微秒, 侧向扩散系数 $D_{lat}=3 \times 10^{-10} \text{cm}^2/\text{秒}$ 。这个测定结果和其他作者的测定结果大体相近。事实上Sackmann, Träuble等证明蛋白在膜中的旋转运动是由于膜脂双分子层中脂分子的迅速侧向扩散运动的结果。

(二) 膜蛋白和膜脂的相互作用

前面谈到Sackmann等(1973)对肝内质网膜细胞色素 P_{450} —细胞色素 P_{450} 还原酶羟化酶系统的研究证明在酶蛋白周围的一层磷脂分子(脂圈)与脂双分子层的流动脂不同, 具有晶态结构, 仅在 32°C 以上才出现相变形成流体态, 这时才能使脂溶性的底物, 如脂肪酸和芳香胺等进入酶复合体。因此脂分子层的“脂圈”在 P_{450} 系统参与的脂过氧化作用和固醇的羟化作用中具有调控作用。同样, 脂的过氧化和固醇的羟化又反过来对脂的流体性具有某种反馈调控作用。

近来, Sackmann 实验室对膜蛋白与膜蛋白及其与脂的相互关系又进行了新的研究, 他们用多粘菌素 (Polymyxin B) 与合成的磷脂酸的双分子层膜相结合, 用荧光光谱, ESR—光谱和电镜冰冻刻蚀等技术。以DPH (具有偏振荧光的染料) 和苝癸酸 (可形成激发态稳定双体的荧光染料) 两种荧光探针测定膜脂的相变, 以带有电子计算机可连续记录偏振度和“双体”, “单体”比例的Schoeffel荧光分光光度计进行测定。结果表明多粘菌素能紧密结合于极性脂分子层。由于脂和多粘菌素的脂肪链之间的相互作用, 膜脂的相变温度明显降低 (对二棕榈酰磷脂酸而言, 约降低 20°C)。他们对这种现象用 Lindeman 法则的晶体脂晶格的扩张来解释。在加入多粘菌素到磷脂酸膜囊泡中可观察到 2 个明显的相变区 (温度范围 $\Delta T=5^{\circ}\text{C}$)。高温度的相变温度是纯粹磷脂酸脂的 T_t (55°C), 而低温度的相变温度是脂与多肽 (多粘菌素) 相结合时的 T_t (33°C)。这些相变温度明显分开说明膜脂双分子层表现出不均一的自由脂与结合脂的分区; 前者是流体态, 后者是结晶态。此种区块结构在电镜下 (冰冻刻蚀) 也直接观察到。在 1:1 比例的合成磷脂酸和卵磷脂的混合膜中, 多粘菌素仅与极性磷脂酸结合诱发极性脂形成区块结构, 并分散于卵磷脂的流体基质中。

用上述两种荧光探针测定脂与多粘菌素结合的部分与后者浓度大致呈函数关系, 获得 S 形结合曲线。 Ca^{++} 与磷脂酸相结合也获得相同结果, 但聚赖氨酸则表现为直线性的结合曲线。S 形结合曲线可解释为脂与配基 (Ca^{++} , 多粘菌素) 相互作用是一种协同效应。他们还提出一种理论模型来解释多肽 (多粘菌素) 与膜表面的结合, 是一种弹性力的结合。认为这是由于此种高度不对称的多肽结构作用于膜脂基质将引起后者产生强烈的不对称变形。为了减少这种弹力变形的能量, 在多粘菌素周围的脂分子层将出现一种弯曲排列, 这将导致产生吸引力或排斥力 (依两种分子的协同取向而定)。定量分析表明这种弹性力作用于一个相当大的范围, 在 $100\text{\AA}$ 的范围内作用力相当于 10^{-7} 达因 (相当于相互作用的能量在 0.1 电子伏左右)。他们推测, 多粘菌素作用于细菌膜可能与其产生孔道 (在区块结构中心) 增加膜透性有关。

根据以上试验结果, H. Gruler 和 E. Sackmann 等最近 (1977) 提出了膜中蛋白——蛋白长距离相互作用的非 Van der Waals 力的新理论模型。他们主要根据膜脂基质中“定向弹力场”的概念提出的。他们认为, 与膜结合的蛋白可引起平均脂分子方向的变化, 然后通过脂定向弹力作用长距离地把这种变化传递给第二个蛋白。为此产生的“弹性力场”将引起蛋白之间的排斥或吸引力。这种类型的相互作用在有序排列的流体之间的变形来说是长距离力作用的一种特殊情况。这与膜中由脂分子中介的蛋白——蛋白之间相互作用非常相似。

在生物膜中, 对于酶复合体的形成来说, 膜结合的大分子之间的长距离相互作用是相当重要的。因此蛋白

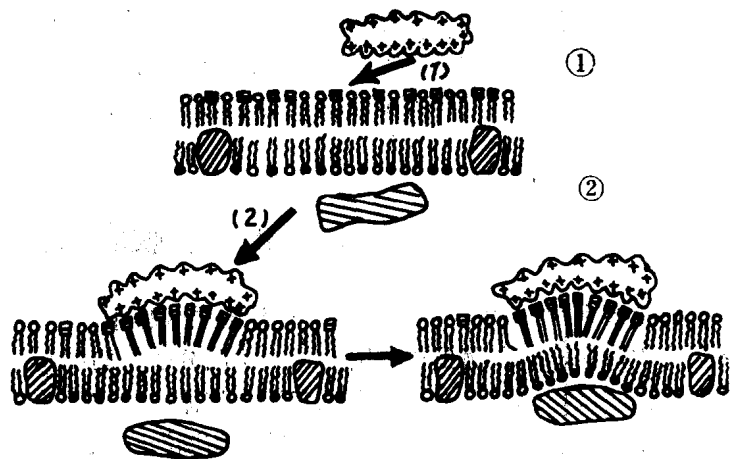


图 1
① 外侧 ② 内侧

在脂区块内的凝聚作用也可能是在蛋白与蛋白之间连系方面的变化中起一种有效的诱发作用。例如带电荷化合物诱导膜脂中的区块结构的形成也可能提供蛋白—蛋白之间跨膜连系的一种机制：第一步具有电荷的蛋白质类化合物与膜表面相反电荷的脂分子结合后引起区块结构的形成，根据弹性力场理论区块将引起局部弯曲（由于在极性脂/水界面上的离子强度改变），结果，另一方面的脂分子层的弯曲面也相应调整，这可能通过下述两种途径实现①内层脂分子的重新分布②通过另一种蛋白与内层的极性介面相连接。因此而导致蛋白—蛋白之间的一种跨膜连系或者实现某种信息的传递（见图1）。

(三) 关于光学探针（激发态稳定双体） 在生物膜研究中的应用

1954年Förster和Kaspes发现芘（Pyrene）的激发态稳定双体对光物理和光化学的发展起了很大的促进作用。1970年英国牛津大学Radda实验室首先把芘的衍生物（Pyrene-3-sulphonic acid）引入膜结构的流动性的研究。73年以来西德的Sackmann实验室比较系统的应用了这一技术，在膜的相变，侧面扩散，分相及脂交换动力学等方面进行了研究，由于测定激发态稳定双体能获得比一般荧光探针（如ANS, Perylene等）更多的膜结构的信息。而且又无光散射变化造成的误差，因此具有较广泛的应用前景。他们主要以芘和芘的癸酸衍生物作为探针，应用二维布朗运动模型克服了把Stnoluchowski的理论用于膜结构二维体系方面的困难，因此发展了这种技术在膜研究方面的应用，其主要点如下：

(1) 激发态稳定双体（Excimer）和单体的量子产率的比值（ φ'/φ ）与缔合常数 K_a 有关：

$$\varphi'/\varphi = \frac{I'}{HI} = \frac{kf'\tau_0 \cdot C}{kf(1 + k_a\tau_0')} k_a \quad (1)$$

(2) kf/kf' 是双体的固有性质，它不取决于溶剂，由于 $kf = \varphi/\tau_0$ ， $kf' = \varphi'/\tau_0'$ ，所以 kf/kf' 可以通过测荧光寿命 τ_0 和 τ_0' 而求得，而绝对量子产率在有机溶剂中是处于很低浓度（单体发射）和很高浓度（双体发射）的范围内。用壬烷作溶剂，Sackmann等测定结果， $kf/kf' \approx 0.14$ （芘癸酸）， $kf/kf' \approx 0.1$ （芘）。当没有单体发射的情况下，双体的荧光寿命 τ_0' 可以在很高浓度情况下测定。

(3) 双体的形成涉及到缔合反应与解离反应的竞争。当缔合反应占优势时，式(1)中分母的括弧 $(1 + k_a\tau_0')$ 可用1代替。根据Förster和Seidel (1965)， I'/I 比值对温度的依赖性应该服从Arrhenius型方程式。

$$\nu = I'/I = \alpha \exp \cdot \{\Delta E_a/RT\}$$

ΔE_a 是表征标记物布朗运动的活化能的测定，在膜中 I'/I 表现为指数的作用。在温度低于70℃情况下，反应式(1)中的 $K_a \cdot \tau_0'$ 可以忽略。

(4) 浓度 C 在二维液体中可定义为每单位区 (cm^2) 的分子数。在标记物低浓度时，它所引起的脂单分子层的侧向扩张可以忽略不计。因而， C 可以用 $C = \gamma/F$ 表示。 γ 是标记物对脂的克分子比值， F 是每个脂分子的面积 (cm^2)，若 C 用每 cm^2 的分子来测量，则 K_a 的大小为 $[K_a] = 1 \times \text{cm}^2 \times \text{分子}^{-1} \times \text{秒}^{-1}$ 。

(5) 用 $H=0.8$ 代表芘的数值， $H=0.62$ 代表芘癸酸的值。因此 K_a 可以通过测定 I'/I 比

来求得。而测定 I'/I 比的最大优点在于可以排除膜悬液由于其中构象发生变化所引起光散射的误差。

根据上述情况Sackmann实验室在下述几方面应用于膜结构的研究：

(1) 侧向扩散系数的测定：

例如，在卵磷脂膜中在60°C时，苾癸酸的扩散系数 $D=8 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{秒}$ ，此值与分子的跳动频率(hopping frequency) $\nu=2.5 \times 10^7$ 相当苾在脂疏水中心区的侧向运动要快2.5倍。若双体形成和自旋标记化合物的交换反应只在邻近的分子间有效的话，则此种扩散系数的测定结果与自旋光谱的研究结果是很一致的。

在磷脂酸(DPA)的膜中，双体形成速率($K_a \cdot c$)比在卵磷脂膜中要高的多。这是由于DPA有更紧密的侧向排列，他们测得 $F_A=43 \text{\AA}^2$ (每个DPA分子在 $\text{pH}=9.0$ 时的面积)，在 pH 低到7.8时，此时由于DPA仅带一个负电荷，其侧面面积要压缩12%。

(2) 侧面分相

在测定膜侧面分相时，Excimer探针可用于测定膜中流体区和刚性区的相对数量，用于在膜刚性区(晶态)中，Excimer的溶解度极低，而被排出，因此其有效浓度的增加和由它导致 I'/I 的增高可以作为定量研究。他们用DPA和DPL(二棕榈酰卵磷脂)的混合磷脂膜，在不同温度和 Ca^{++} 的影响下进行了这方面的测定。

(3) 脂交换动力学的研究

双体(Excimer)的形成同样可用于研究各种膜之间的交换动力学，例如，测定磷脂在两个单分子层膜脂之间的交换等。他们发现在DPL和DSP(二硬脂酰卵磷脂)二种单分子脂膜之间，在60°C，20小时才出现一个单一的宽区相变范围。电镜检查并未发现两种膜囊泡的融合，因此上述结果实际上反应两种膜之间脂的交换，但在相变温度以下，即使90小时的混合后，也未发现交换现象。

但是，与磷脂不同，如脂肪酸(如苾癸酸)或非极性化合物(如苾)在膜间的交换却很快，这种交换服从一级反应动力学，在相变温度以上时，交换速率 $k_{ex} \approx 1 \text{sec}^{-1}$ ，但在相变温度以下时，则 k_{ex} 呈现大幅度地下降(0.2sec^{-1})，他们认为这种膜结合的分子在膜之间的交换反应，在亚细胞结构之间的通讯方面可能是一种重要途径。

二、线粒体膜的结构与功能

从我们参观的17个研究单位来看，西德线粒体膜结构与功能的研究主要开展下列几方面工作：

(一) 线粒体内膜ADP-ATP运转的研究，(二) 线粒体内膜辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物的分离、提纯、析离与重组，(三) 线粒体生物发生的研究，(四) 线粒体内膜的 Ca^{2+} 运转功能，现分别简述如下：

(一) 线粒体内膜ADP-ATP运转的研究

慕尼黑大学生理化学、物理生物化学和细胞生物化学研究所Klingenberg教授研究线粒体呼吸链和氧化磷酸化在国际上颇有声誉。近十多年来，对线粒体内膜ADP-ATP运转进行了

较多的研究。

线粒体内膜含有呼吸链组分和氧化磷酸化酶系，它的主要功能是转换能量，但是以后逐渐发现线粒体内膜对于三羧酸循环的组分，氧化磷酸化和底物水平磷酸化的磷酸转移反应的底物均有特异的运转功能，其中ADP-ATP的运转比较重要。在氧化磷酸化进行过程中，ADP不断从线粒体外的细胞质中通过内膜进入线粒体的基质中，与此同时氧化磷酸化反应形成的ATP则不断输出至细胞质中供给细胞各种活动的需要，因此广义来讲，ADP-ATP交换可视为整个氧化磷酸化反应的一个组成部分（图2）。

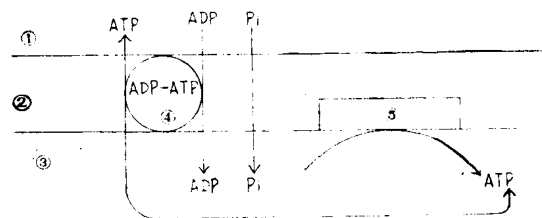


图 2

①细胞质；②内膜；③基质；
④ADP-ATP载体；⑤氧化磷酸化。

ADP与ATP的这种易位交换是以1:1的比例来进行的，而且特异性很高，AMP、GDP、UDP、IDP等都不能通过内膜运转。通过一系列研究说明线粒体内膜含有一种使ADP-ATP进行运转的特异载体。在具有正常偶联磷酸化的完整线粒体中ADP、ATP与载体结合的专一性因运转方向不同而有差异。向线粒体基质内运转时，ADP比ATP更易与载体相结合，反之，向线粒体外部运转时ATP与载体更易结合，因而使线粒体内外ATP/ADP形成很大的差异。

	ATP/ADP
线粒体内	3.9'
线粒体外	29.0

如果线粒体处于解偶联状态，则ATP、ADP与载体结合专一性是等同的，因而，线粒体内外ATP/ADP的差异也就消失，这说明这种差异需要由氧化磷酸化产生的能量来维持。

对ADP-ATP运转有两种很特异而又高效的抑制剂：atractylate (ATR) 及其衍生物 carboxyatractylate (CAT) 和 bongkrekate (BKA)，前者系从蓟 (*Atractylis gummifera*) 根中提取，是糖苷 (glucoside) 类化合物，后者从 *Pseudomonas cocovenenans* 中提取，是一种含有三个羧基不饱和的长链脂肪酸的剧毒物质。

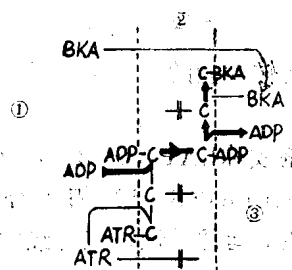


图 3

①细胞质；②线粒体内膜；
③基质。

值得注意的是，ATR 与 BKA 产生抑制作用的条件（如 pH，温度等）并不一致，而且物理性质也有差异。前者系亲水物质不能通过膜，后者则是脂溶性物质容易通过膜，根据上述情况以及其它的研究结果，Klingenberg 提出“重定向机理 (Reorientation mechanism)”来解释 ADP-ATP 通过线粒体内膜运转过程和 ATR 与 BKA 的抑制作用（图3）。

根据这种假说，BKA 是脂溶性物质，通过内膜在基质一侧与 ADP-ATP 载体相结合。ATR 系水溶性物质不能通过膜，只能在内膜外侧与载体相结合。与 ATR 或 BKA 结合后的载体就不能再运转。这种假说还认为 ADP-ATP 载体在线粒体内膜两侧可能具有两种不同的构型，内膜外侧时呈 C 态，ATR 能与之专一结合。内膜基质一侧呈 M 态，BKA 能与之专一结合。换言之，ADP-ATP 载体在线粒体内膜两侧的结合位点的构型具有不对称性。ADP-ATP 的运转可能就是通过载体蛋白的这种特性来实现的。

近年来, Klingenberg实验室对ADP-ATP载体蛋白构型的不对称性又进行了不少研究, 下列实验结果对这种假说是有利的:

(1) ADP-ATP载体蛋白在线粒体内膜两侧与BKA或ATR亲和力的测定(表1)。

表 1

ADP-ATP载体蛋白	亲 和 力		
C 态	ATR	BKA	ADP、ATP
	高	低	中 等
M 态	低	高	中 等

(2) 将ATR和BKA分别与ADP-ATP载体蛋白相结合, 进行分离提纯并比较其一级结构和其它性质(对蛋白水解酶作用的敏感性、免疫专一性等)。实验结果说明, 与ATR和BKA相结合的ADP-ATP载体蛋白(即C态和M态)的氨基酸组分虽然没有差异, 但它们的构型是不相同的。

(3) 分离的BKA-载体蛋白复合物在ADP存在下可以转变成ATR-载体蛋白复合物。

根据上述及其它研究结果, Klingenberg提出ADP-ATP通过线粒体内膜运转的“转换位点的固定载体(Fixed Switching site)”模型(图4)。

这一模型的要点是:

- (1) ADP-ATP载体在线粒体内膜上的分布是固定的。
- (2) ADP-ATP载体在内膜两侧结合位点的构型是不对称的。
- (3) ADP-ATP载体在内膜两侧的结合点不是同时处于开放状态。

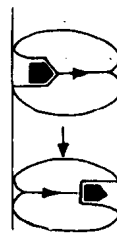


图4 “转换位点的固定载体”模型

这一模型既不同于转动载体模型, 也与孔道假说有差别, 显然要检验这一模型的可靠性还需进行大量的工作, Klingenberg实验室认为: ADP-ATP载体蛋白在线粒体内膜中含量较多(约占线粒体蛋白9.5%), 分子量只有30000左右, 又有非常专一的两种抑制剂(ATR与BKA), 因此对于研究膜的运转功能的分子机理是一个较好的研究对象。

去年Klingenberg实验室应用Aminoxide WS-35(一种去垢剂或称LAPAO, 3-Lauramido-N, N-dimethyl-propylaminoxide) 分离提纯没有抑制剂(ATR或BKA)相结合的ADP-ATP载体蛋白, 并成功地重组于脂质体中, 表现出ADP-ATP运转活性。但与线粒体相比, ADP-ATP转换率只有8%左右。

(二) 线粒体内膜辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物的分离、提纯、析离与重组

1. 慕尼黑大学生理化学、物理生物化学、细胞生物研究所 Klingenberg 实验室 Von Jagow等用去垢剂Triton X-100将辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物(即呼吸链复合物III, 内含细胞色素b、c₁、铁硫蛋白等)从牛心亚线粒体抽提下来, 然后加入抗霉素A使之与其

中的 bc_1 组份相结合，离心后的上清液通过羟基磷灰石层析柱进行分离。这样得到的 bc_1 复合物非血红素铁蛋白含量很低，几乎不含辅酶Q和磷脂，也无辅酶Q-细胞色素c还原酶的活性。产率约50%左右。这种纯度较高的 bc_1 复合物在一定条件下可以进一步将b与 c_1 分开，并使之逐步从层析柱上洗脱下来，得到纯度约为90%，以二聚体方式存在，分子量为62,000的细胞色素b。

2. 欧洲分子生物学中心实验室的Weiss (原在Klingenberg实验室工作) 从链孢霉 (*Neurospora Crassa*) 的线粒体中提取辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物，根据氧化型细胞色素c与细胞色素b亲和力较大 ($K_d < 10^{-7} M$)，还原型细胞色素c与细胞色素b亲和力较小 ($K_d < 10^{-5} M$) 的特性，利用亲和层析法来进行分离。他们先将氧化型细胞色素c固着于琼脂糖，然后将用Triton X-100从线粒体内膜溶解下来的溶液通过层析柱，辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物即结合在上面，之后用抗坏血酸将固着于琼脂糖的细胞色素c进行还原，这时由于亲和力的改变就可以使细胞色素c解离，因而使辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物洗脱下来。在分离过程中氧化型细胞色素c如同辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物的底物，而还原型细胞色素c可视为作用产物，这种亲和层析法的优点在于分离过程是按照生物学功能来设计的。

链孢霉线粒体辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物内含两个分子细胞色素b (分子量各为30,000) 细胞色素 c_1 (分子量为31,000) 铁硫蛋白 (分子量为25000) 以及5个亚单位 (迄今其辅基尚未阐明，分子量分别为50,000, 45,000, 14,000, 12,000, 8,000)。由于链孢霉线粒体辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物各组份之间结合较弱因此较易分离。上述应用亲和层析法提纯的辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物可通过增加离子强度和应用较强的去垢剂将酶复合物的各组份从琼脂糖层析柱逐步分离、洗脱下来。

应用交联剂 (Cross-linking reagents) 和标记‘修饰’化合物分别对辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物各亚基的相互位置及其在内膜上的分布进行了研究。实验结果表明，酶复合物由疏水性膜的部分和亲水性部分组成。前一部分包括分布于线粒体内膜外侧，以二聚体形式存在的细胞色素b和细胞色素 c_1 ，以及位于基质一侧的分子量为50,000和45,000的两个亚基 (见图5)。

上述用亲和层析法制备的辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物可通过梯度密度超速离心法嵌入卵磷脂脂质体进行重组恢复酶的活性。复合物各组份在一定条件下也可以重组恢复部分活力。

Weiss实验室在建立、改进分离辅酶Q-细胞色素c还原酶复合体方法的基础上正从事这

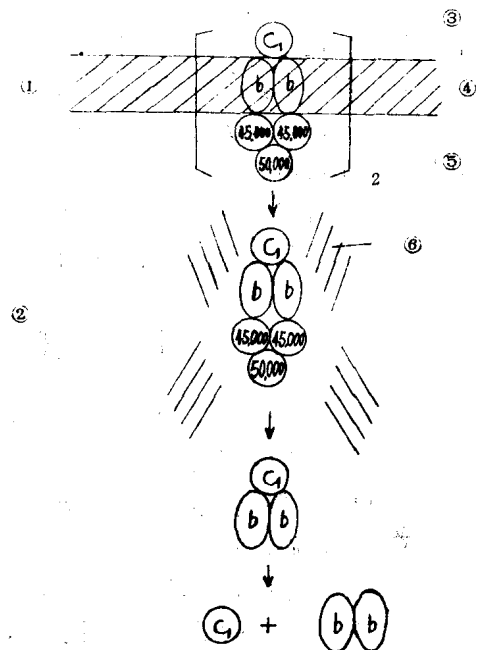


图5 辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物疏水性部分在线粒体内膜上的分布及其析离过程

①二聚体；②单体；③细胞质一侧；
④线粒体膜；⑤基质一侧；⑥磷脂。

一酶复合体各组份的生物合成，它们在线粒体内膜上的分布和相互关系从而进一步阐明它们在能量转换中的作用。

(三) 线粒体的生物发生

线粒体拥有自我繁殖所需的基本组份。但大量的研究结果表明线粒体的自主性很小，换言之，在线粒体生物发生过程中，它的绝大部分都是在细胞质核糖体上合成，然后再与线粒体自身合成的产物进行共同组装的。迄今所知，在线粒体核糖体内所合成的蛋白质为数极为有限，共只10个左右多肽。其中包括细胞色素氧化酶7个亚单位中的3个较大亚单位、辅酶Q-细胞色素c还原酶中的个别亚单位，ATP酶复合体中基部4个亚单位。

西德在慕尼黑大学生理化学、物理生物化学、细胞生物研究所和欧洲分子生物学中心实验室对线粒体的生物发生和自主性也开展了一些工作，上面曾提到欧洲分子生物学中心实验室的Weiss等对链孢霉线粒体辅酶Q-细胞色素c还原酶复合物的生物合成进行了研究。在实验中他们应用两种专一性蛋白质合成抑制剂：放线菌酮（专一抑制细胞质蛋白质合成）和氯霉素（专一抑制线粒体蛋白质合成）。从同位素标记化合物参入结果来看，该酶复合体中只有细胞色素b是在线粒体核糖体上合成的，其他组份都是在细胞质核糖体上合成的。

慕尼黑大学生理化学、物理生物化学、细胞生物研究所的Sebald对线粒体ATP酶的复合体的生物合成进行了研究。实验结果表明线粒体内膜ATP酶复合体的生物合成依赖于细胞质和线粒体蛋白质合成体系的共同作用。ATP酶复合体基部的疏水蛋白部分是在线粒体核糖体上合成的，但他认为酵母与链孢霉的情况也许有差别。很可能后者ATP酶的疏水蛋白部分是在细胞质中的核糖体上合成的。最近Sebald开展另一方面的工作，应用固相序列分析法从进化角度对酵母、链孢霉、嗜盐菌和大肠杆菌ATP酶复合体DCCD结合蛋白（也即ATP酶复合体基部的疏水蛋白部分）的组份进行分析比较。

(四) 线粒体内膜的 Ca^{2+} 运转功能

马克思—普朗克协会生物物理化学研究所神经化学研究室Schmidt研究电鱼（Torpedo）神经末梢线粒体受电刺激后 Ca^{2+} 含量的变化。用原子吸收分光光度计测定 Ca^{2+} 变化的结果表明，受电刺激后线粒体 Ca^{2+} 含量降低80%。这一工作刚开始不久，因此对这一现象的生理意义及其机理尚未开展系统研究。

Freiburg大学生物系第Ⅲ研究所Marmè等研究植物细胞内 Ca^{2+} 含量的调节问题，他们发现线粒体膜具有主动吸收 Ca^{2+} 的功能，因而也参与了整个细胞 Ca^{2+} 含量的调节作用。

三、生物膜能量转换ATP酶复合体的研究

总的讲，西德这方面的研究不很多，主要集中在几种细菌（如：*E. Coli*, *Micrococcus*, *Sp*等）质膜ATPase复合体，但也有一些自己的特色：

(一) DCCD—结合蛋白氨基酸序列的测定

DCCD—结合蛋白是ATPase复合体中一个重要组份。属于膜基部的结构蛋白（疏水蛋白）它在 H^+ 的转移中有重要作用。慕尼黑大学Seibald实验室近来对大肠杆菌、链孢霉和酵母线粒体内膜的DCCD—结合蛋白的氨基酸序列进行分析主要采用Edman降解反应以固相肽段序列分析仪进行。约已测定80多个氨基酸，估计不久即可完成。因为这部分分子量仅在10000左右。他们发现在*E. Coli*中DCCD结合在蛋白的门冬氨酸上，而在链孢霉和酵母中，DCCD都结合在谷氨酸分子上。他们认为从生物进化的观点看这可能是有意义的。

(二) ATPase(F_1)亚基的研究

马克思—普朗克协会生物研究所Vogel博士等在*E. Coli*质膜的 BF_1 的亚基结构上的研究有其一定的特色，他们把纯化 BF_1 分为 I_A 、 II （分子量各为100,000）两大亚部份和 I_B （分子量为54,000）一个小亚部份。 δ 亚基包括在 I_B 这部份，三者重组后可恢复酶活力和ATP推动的ACMA荧光熄灭反应。SDS凝胶电泳分析为5个亚基，分子量分别为56000, 52000, 32000, 21000和11500，根据免疫测定，和亚基比较，他们认为 I_A 含有 α 、 γ 和 ϵ 三个亚基； II 含有 β 亚基，重组试验证明 I_A ： II 的比例是1:1，因此，他们提出ATPase (BF_1) 的各亚基的化学计量关系是 $(\alpha, \gamma, \epsilon)_2(\beta)_2\delta_{1-2}$ ，而不是通常认为的 $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ 的比例。近来，他们又进一步用四种*E. Coli*的变株和野生型的*E. Coli*的 BF_1 的亚部分进行杂交重组，结果发现野生型 I_A 可以和四种变株（ BH_{212} ， BH_{723} ， $DG^{20/1}$ ， $DG^{20/5}$ ）的 II 分别重组获得正常的酶活力和能量转换反应（与膜重组时），反过来，野生型的 II 与变株的 I_A 重组则不能恢复酶活力。他们分析，*E. Coli* ATP酶变株主要可能在于 α 和 γ 这两个亚基上发生变异，而 β 和 δ 亚基保持正常，他们正在寻找 β 亚基变异的菌株，初步探索 BH_{526} 可能有些希望，这方面的工作对分析ATPase的亚基的功能方面是一条很有希望的途径。

(三) Micrococcus的 BF_1 的研究

Frankfurt大学Fasold教授主要研究ATP类似物（Nb-S⁶-ITP）与Micrococcus的 BF_1 进行结合实验，他们发现，Nb-S⁶-ITP以共价键和非共价键两种方式与 BF_1 结合，产生不可逆的抑制，结合动力学研究进一步证明Nb-S⁶-ITP有“短期”抑制和“长期”抑制两个过程。两者可能均结合在同一个位置上。标记的Nb-S⁶-ITP结合证明结合发生在 β 亚基上，半胱氨酸残基与之无关，根据结合试验他们以构象学说来解释 BF_1 与Nb-S⁶-ITP的相互作用。

四、物 质 运 送

物质运这是生物膜的重要功能之一，生物膜系由双层磷脂为骨架所组成。从模拟人工膜的研究知道亲水物质对双层脂膜的通透性极低。但在生物膜，由于有专一的通道、载体或酶系的存在，使一些离子与亲水性物质能够迅速地通过生物膜，这样维持了细胞内环境的恒

定,保证了营养的摄取与代谢产物的排出,保证了可兴奋膜的极化与去极化过程。生物膜的运送过程一般可以分成四类:

1. 被动扩散 物质由于在膜二侧存在有浓度差,通过专一的通道(例如阴离子通过红血球膜上Band 3 蛋白),从浓度高的一侧扩散到另一侧,直至二侧浓度相等。

2. 促进扩散 膜上载体与被运送的物质相结合,由于载体可在膜上往返运动,就把物质从膜的一侧迅速地传送到另一侧。载体往往与被运送的物质产生专一的结合,这种结合酷似酶与底物形成ES络合物的结合。

3. 主动运送 是一种消耗自由能的传送过程。在这里,物质可以从低浓度一侧向高浓度一侧运送,这样就保证了某些物质在细胞内的积聚。

4. 伴随运送 某些物质对抗渗透压进行的主动运送并不直接利用ATP的自由能,而是利用细胞膜内外钠离子浓度的梯度,这些物质与 Na^+ 一起从膜外侧运送到细胞内,而 Na^+ 再通过 Na^+ , K^+ -ATP酶被运送到细胞外。

西德生物膜的研究有相当一部份力量集中于物质运送的研究上,例如马克思-普朗克协会生物物理研究所全部研究物质运送。此外西德也有不少单位研究叶绿体、线粒体、肌质网系、核膜等的物质运送过程。总的说来,研究的主要内容有:

- (1) 物质运送的理论研究。
- (2) 分离、提取与鉴定负责物质运送的载体蛋白或通道。
- (3) 阐明某个物质运送系统的性质。
- (4) 重组某个物质的运送体系。

现将西德生物膜物质运送方面的研究情况简述如下:

(一) 质膜的离子运送

1. 阳离子运送

一价阳离子的运送不仅与神经肌肉兴奋的传导有密切关系而且与其它物质如氨基酸、葡萄糖的伴随运送有关。马克思-普朗克协会生物物理研究所Koepsell 采用Jöngson的SDS方法从大鼠肾脏提取钠钾ATP酶的膜制剂。他发现负染的膜制剂含有直径为40 Å的颗粒,但同样的膜制剂在冰冻蚀刻切片上颗粒数目要比负染切片少四倍。在酶活力的测定上他们发现酶活力的Hill作图呈直线,说明有协同效应。综合这些结果,Koepsell设想钠钾ATP酶在膜中可能以四聚体形式存在。Koepsell尚发现钠钾ATP酶的抗体对酶活力的抑制受 Na^+ , K^+ 浓度的影响, K^+ 使抑制增大而 Na^+ 使抑制减弱,从而提示了 Na^+ 与 K^+ 诱导酶产生构象的改变。

HCO_3^- 激活ATP酶存在于胃、胰、肾、唾液腺与导管上皮细胞的腔面膜,它在质膜上的位置正好与 Na^+ , K^+ -ATP酶相对应。除 HCO_3^- 外, SO_3^- 、 SeO_3^- 、 B_4O_7^- 、 H_2AsO_2^- 也有激活作用。少量 K^+ 大大促进酶对 HCO_3^- 的亲合力而 Na^+ 与 Ca^{++} 没有这种作用。Freiburg大学的Kreutz设想膜结合的 HCO_3^- 激活ATP酶的作用在于促进 H^+ 与 K^+ 的相对传送, H^+ 进入细胞内而 K^+ 运送到细胞外。

2. 阴离子运送

马克思-普朗克协会生物物理所 Passow 教授领导的细胞生理室主要研究红血球膜的阴离子运送,而重新封闭的红血球空泡则是研究红血球膜运送过程的一个重要的实验手段。Wood发展了一种新的制备方法,制备重新封闭对 K^+ 不通透且动力学上匀一的红血球空泡。

他将低渗涨破的红血球在 0 °C 通过 Bio-gel A 柱, 使红血球膜与血红蛋白分离, Bio-gel A 柱的上 1/3 pH 为 7.6, 有利于膜与血红蛋白的分离, 下 2/3 的 pH 为 6.0, 有利于随后红血球空泡的重新封闭。当膜从柱上流出后即 用 3 M 氯化钾使 KCl 最终浓度为 150mM, 然后在 37°C 保温 1 小时使空泡重新封闭。如果在重新封闭前把荧光指示剂参入空泡内, 那就可以显示阴离子运送过程中空泡内的 pH 变化。

红血球膜上固有蛋白 Band 3 蛋白是阴离子通道, Passow 实验室应用抑制剂差标记的方法也证实了这一点。此外虽然 Cl^- 进入红血球的速度要比 SO_4^{2-} 快得多, 然而 40—50 种不同的阴离子运送抑制剂对 Cl^- 与 SO_4^{2-} 运送的抑制程度却相同, 说明 Cl^- 与 SO_4^{2-} 确是由同一个蛋白运送的。他们还用乙酸电泳的方法来制备 Band 3 蛋白, 并且把提取的 Band 3 蛋白重组到单层脂膜与双层脂膜中去, 结果发现胆固醇对重组有明显的影响。

Passow 实验室的 Rudloff 还研究红血球膜的 Spectrin, 利用低离子强度抽提而后再用 Sepharose 柱分离, 得到纯化的 Spectrin。Spectrin 在红血球膜的内侧可能与维持红血球的形状有关。

(二) 上皮细胞腔面膜的物质运送

近年来关于糖、氨基酸等在肾脏近侧曲管的运送的知识积累得很快, 这主要是由于发展了分离腔面膜与对腔面膜 (contraluminal) 的技术。对于质膜的不同区域进行分离过去遇到不少困难, 马克思-普朗克协会生物物理所 Ullrich 教授实验室的 Kinne 利用自由电泳方法制备腔面膜小泡与对腔面膜小泡, 发现二者化学性质有不少差异:

腔面膜 (刷缘膜)	对腔面膜 (基底面膜)
碱性磷酸脂酶	Na^+ , K^+ -ATP 酶
cAMP 激活蛋白激酶	甲状旁腺激活腺苷环化酶
HCO_3^- 激活 ATP 酶	Ca^{++} -ATP 酶
氨肽酶	与 Na^+ 无关的葡萄糖、氨基酸等的运送
葡萄糖、氨基酸与钠的伴随运送系统	

在近侧曲管, 由钠钾 ATP 酶作用所产生的钠离子梯度, 使葡萄糖等通过腔面膜摄入肾小管上皮细胞, 以后再通过对腔面膜以与 Na^+ 无关的方式运出而进入血液, 这样就完成了重吸收的作用。Kinne 已经成功地从腔面膜小泡用 0.5% Triton X-100 抽提蛋白, 并与磷脂重组, 获得 Na^+ 激活葡萄糖、氨基酸等的运送的活力, 目前他正在分离各个运送蛋白。

小肠的氨基酸吸收过程大致与上述肾小管情况相仿: Na^+ 梯度促进中性氨基酸通过腔面膜运送, 上皮细胞中高浓度的中性氨基酸通过基底面与侧面膜的促进扩散而进入间质。

(三) 酶通过质膜的释放

在胰腺腺细胞中有着酶元颗粒, Ullrich 实验室发现 Ca^{++} 促进胰腺腺细胞质膜与酶元颗粒的结合, 这种结合关系到膜上蛋白质的相互识别作用, 也是酶元颗粒与腺细胞膜融合而

后释放这个总过程的第一步。

(四) 大肠杆菌 β -半乳糖苷的运送

大肠杆菌 β -半乳糖苷的主动运送是通过膜上乳糖载体(乳糖通透酶, M蛋白)这个专一蛋白进行的。运送能量可由呼吸或 Mg^{++} 和 Ca^{++} ATP 酶水解 ATP 而提供。实际上呼吸或 ATP 水解产生膜两侧的质子梯度, 而 β -半乳糖苷与质子伴随传递而进入膜内。自从 1965 年 Kennedy 证明乳糖载体是一个分子量为 31,000 的膜蛋白以来至今在分离提纯方面进展甚慢。马克思-普朗克协会生物所 Overath 教授等人从丢失 Z 基因的大肠杆菌变株分离得到乳糖操纵子, 把它接到质体上, 含杂交的质体的菌在受乳糖诱导时即能产生大量乳糖载体, 达到膜蛋白的 15%, 比野生菌高 5—10 倍, 这个工作实际上是把遗传工程技术应用于生物膜的研究上, 为提纯乳糖载体创造了条件。Overath 发现正常定向与内翻外的膜小泡的乳糖运送速度相同, 因而认为大肠杆菌乳糖载体在膜上的分布是对称的。他还根据大肠杆菌膜脂相变的温度曲线与 β -半乳糖苷运送的温度曲线(Arrhenius 作图)很相似, 认为乳糖载体在运送 β -半乳糖苷时与磷脂有相当明显的相互作用, 而载体蛋白在液态脂中的分配比在有序脂中要大 2—20 倍, 这一点与载体在膜二侧对称分布是相符的。

(五) 海水淡化的理论研究

马克思-普朗克协会生物物理研究所化学研究室 Schlöge 教授研究物质横过膜运送的物理化学原则, 他们用乙酰纤维素类膜制剂来研究扩散、静电压与电场在离子运送过程中所起的作用。他们一方面企图用他们计算和实验的结果来解释生物膜运送的原理。另一方面与工厂配合, 生产海水淡化用的人工膜, 去盐率达到 99.9% 以上, 这种海水淡化装置已在北海的一个岛屿上运转, 供应岛上居民以淡水。

五、肌质网膜钙泵的研究

在骨骼肌的肌纤维之间充满着以管状或液泡状存在的肌质网。当肌肉进行快速收缩和松弛过程中会发生大量钙离子突然释放和吸收。近年来已有很多实验说明钙离子的吸收主要系由于肌质网膜的钙泵功能。肌质网膜系统具有效率很高、容量很大的运转功能。在 ~ 20 —100 毫秒时间内每克肌肉能将 0.2μ mole Ca^{2+} 从收缩系统中加以吸收。肌质网膜内外钙浓度比可高达 10000 倍。这是一种主动运转。肌质网膜运转钙离子的功能蛋白同时又是一种钙离子激活的 ATP 酶。钙离子主动运转的能量来自 ATP。肌质网膜的功能比较专一, 迄今所知, 钙离子主动运转是其唯一功能, 其组分相对讲又比较简单, 容易大量分离和提纯, 因此对研究生物膜的化学能、渗透能相互转换来说它是一种较理想的实验材料。从骨骼肌分离的肌质网膜是一种封闭式囊状结构, 直径为 1000 微米, 膜的 65% 为磷脂, 35% 为蛋白质。从肌质网膜分离的运转单位是一种分子量约为 100,000 的蛋白质, 约占膜蛋白的 10—15%。西德海德堡医学研究所 Hasselbach 教授领导的生理实验室研究这方面工作已有十余年历史。其主要研究结果有下列三方面: